

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Borković

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Borković

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA  
ODREĐIVANJE ALENDRONATA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof.dr.sc Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

dr. sc. Mirta Čizmić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2016.

*Ovaj završni rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na predloženoj temi, pomoći i iskazanom povjerenju pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se asistentici dr.sc Mirti Čizmić na savjetima, uloženom vremenu, trudu i podršci na koju sam uvijek mogla računati.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na susretljivosti i pomoći u svakom trenutku.*

*Na kraju zahvalila bih se svojim roditeljima, sestri i bratu, koji su u svakom trenutku bili uz mene, čija podrška, ljubav i motivacija me dovela do ovog cilja u životu. Hvala Vam i ovaj rad makar mali korak u mom obrazovanju ali velik za mene je za Vas.*

*Hvala mom Dinu, na ljubavi, beskrajnoj podršci i vjeri u mene u svakom trenutku.*

## SAŽETAK

Mnogi farmaceutici i proizvodi za osobnu higijenu danas su prepoznati kao potencijalna zagađivala okoliša diljem svijeta. Skupina antibiotika, poznata kao bisfosfonati danas predstavljaju zlatni standard u liječenju osteoporoze. Zbog učestale primjene i potrošnje u velikim količinama fizičko-kemijskih svojstava poput dobre topljivosti u vodi, potencijalno mogu doći u sve dijelove okoliša. Kada dođu u okoliš, farmaceutici podliježu biotičkim i abiotičkim procesima koji rezultiraju smanjenjem koncentracije osnovne molekule farmaceutika i nastankom razgradnih produkata. Kako bi se moglo razumjeti ponašanje farmaceutika u okolišu, neophodne su analitičke metode koje omogućuju njihovo praćenje u okolišu.

Cilj ovog rada je upoznati se s analitičkim metodama određivanja alendronata, farmaceutika iz skupine bisfosfonata. Na temelju dostupne literature može se reći da je metoda za određivanje alendronata tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana s fluorescentnim detektorom ili spektrometrijom masa. U radu je dan pregled metoda određivanja alendronata te njihova usporedba na temelju izvedbenih značajki određenih tijekom validacije metode.

***Ključne riječi:*** farmaceutici, „nova zagađivala“, alendronat, validacija, kromatografske metode

## ABSTRACT

Many pharmaceuticals and personal care products are being recognized as potential environmental risk around the world. Bisphosphonates are group of pharmaceuticals that are being used in treating bone disorders such as osteoporosis. Because of their high consumption rate and their physico–chemical properties, such as high water solubility, they can potentially reach every segment of the environment. Once in the environment, pharmaceuticals undergo biotic and abiotic processes that result in decrease of the main compound and in emergence of degradation products. In order to understand the behavior of pharmaceuticals in the environment it is necessary to develop analytical methods that can be used for their monitoring in the environment.

Analytical methods for determining alendronat, bisphosphonate pharmaceutical, are being presented in this work. Based on literature overview the optimal chromatographic method proved to be high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorescent detector or mass detector. The presented methods were compared based on validation parameters determined during their validation.

**Keywords:** *pharmaceuticals, „new pollutants“, alendronate, validation, chromatographics method*

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Farmaceutici u okolišu .....	2
3. Bisfosfonati .....	6
3.1. Alendronat .....	8
4. Validacija .....	9
4.1. Specifičnost / selektivnost metode .....	10
4.2. Linearnost .....	11
4.3. Preciznost.....	12
4.4. Točnost .....	12
4.5. Granice detekcije i kvantifikacije .....	13
4.6. Robustnost .....	14
5. Metode određivanja alendronata .....	16
5.1. Tekućinskakromatografija (LC) .....	18
5.1.1. Tekućinskakromatografija visoke djelotvornosti .....	19
5.1.2. Kromatografija ionskih parova.....	21
5.2. Spektrometrija masa .....	22
5.3. Fluorescentni detektor .....	23
5.4. Literaturni pregled kromatografskih metoda određivanja alendronata .....	25
6. Zaključak.....	28
7. Literatura.....	29

Životopis

## 1. Uvod

Farmaceutici se svakodnevno koriste u medicini i veterini, a pretpostavlja se da će njihova potrošnja i dalje rasti. Ubrajaju se u tzv. „*nova zagađivala*“ jer su intenzivnija istraživanja vezana uz njihovu pojavu u okolišu započela prije nešto više od dva desetljeća, a do danas nije zakonski regulirano njihovo ispuštanje u okoliš. Velike količine farmaceutika kontinuirano se unose u okoliš putem nepravilnog odlaganja farmaceutskih proizvoda, komunalnih otpadnih voda ili izlučevinate su njihovi tragoviodređeni u pitkim, površinskim i podzemnim vodama. S obzirom da je utvrđeno da tragovi farmaceutika mogu negativno utjecati na živa bića u okolišu, smatramo ih zagađivalima.

Kada dođu u okoliš, farmaceutici podliježu različitim procesima, abiotičkim ili biotičkim, koji rezultiraju strukturnim promjenama farmaceutika i nastajanju novih spojeva koje nazivamo razgradni produkti. Razgradni produkti imaju drugačija fizikalno-kemijska svojstva i farmaceutsku aktivnosti u odnosu na početnu molekulu farmaceutika.

Cilj ovog rada je upoznati se s analitičkim metodama za određivanje alendronatata validacijom kao neophodnim korakom u razvoju svake analitičke metode. Farmaceutici, kao nepohodna pomoć sa sobom nose dosta negativnih posljedica, kako na čovjeka tako i na okoliš. Određivanje farmaceutika je vrlo aktualna tema u posljednja dva desetljeća, jer se i sama proteže kroz sve sfere ljudskog života.



## 2. Farmaceutici u okolišu

Zaštita okoliša je politički ili društveni pokret s ciljem edukacije javnosti o potencijalnim problemima onečišćenja okoliša te poticanja svijesti o rješavanju istih, određujući granice raznih vrsta zagađivanja zraka, tla i vode [1].

Današnja civilizacija razvijena je na paradigmi uzlazne putanje materijalnog rasta te nesvjesnog, prekomjernog korištenje prirodnih resursa i nebrige za okoliš u kojoj treba opstati sadašnja i živjeti buduće generacije. Zaštita okoliša je u današnje vrijeme postala pojam s kojim se susrećemo u svim sferama života, no ekološku svijest ne čine samo saznanje o narušavanju ravnoteže u ekosustavu, već spremnost pojedinca da se odgovorno i ekološki opravdano odnosi prema sredini u kojoj živi [2]. Rastući broj stanovnika, urbanizacija i industrijalizacija dovela je do povećane potražnje i potrošnje vode po stanovniku, koja je samim time postala vrijedna sirovina. Posljedično rastu urbanizacije i industrijalizacije pojavio se problem otpadnih voda opasnih za okoliš budući da sadrže štetne tvari organskog i anorganskog porijekla, a čijom razgradnjom se troši kisik iz vode što u konačnici štetno djeluje na žive organizme u okolišu i na ravnotežu samog ekosustava. Kvaliteta industrijskih otpadnih voda i maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) štetnih toksičnih tvari u vodama propisane su zakonskim regulativama.

Posebno mjesto unutar skupine zagađivala okoliša zauzimaju antropogeni spojevi od kojih su posebno istaknuti farmaceutici i farmaceutski spojevi za koje još ne postoje zakonski propisi čime bi se pratilo njihovo ponašanje u okolišu, odnosno nije zakonski određena maksimalna dopuštena koncentracija u okolišu (MDK). Upravo isti spadaju u tzv. „*nova zagađivala*“. U takvu vrstu zagađivala ubrajaju se farmaceutici, proizvodi za osobnu higijenu, površinski aktivne tvari, steroidi, hormoni, aditivi i pesticidi.

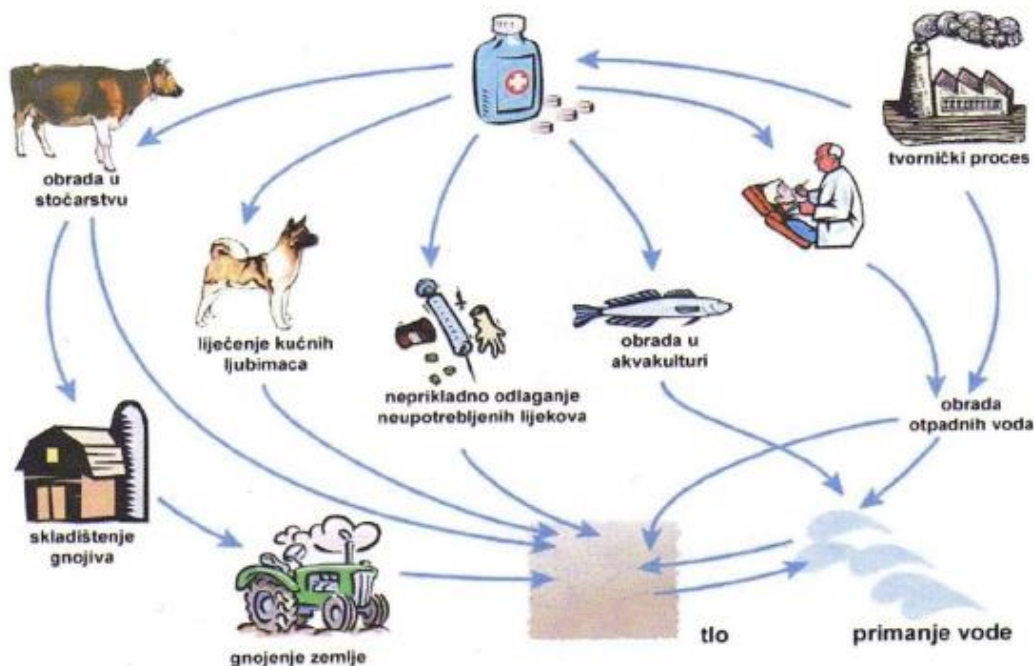
Tek je posljednjih desetljeća prisutnost farmaceutika u okolišu postao svjesni problem i predmet znanstvenih istraživanja budući da su navedeni pridonosili boljoj kvaliteti života modernog čovjeka te se njima nije pridavala velika pozornost. Farmaceutski aktivni spojevi su kompleksne molekule s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima koje se svakodnevno koriste u medicini i veterini, odnosno to su kemijske tvari namjenjene za sprečavanje bolesti, liječenje i dijagnostiku [3]. U svijetu se prema nekim procjenama za humanu medicinu koristi oko 4000 aktivnih farmaceutskih tvari koje imaju različitu terapijsku primjenu, čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100000 tona.

Farmaceutici se dijele s obzirom na strukturu i djelovanje u živom organizmu, analgetike i protuupalne lijekove, antihistaminike, diuretike, antidepresive, antibiotike, antiepileptike, regulatore masnoća u krvi, regulatore tlaka, antitumorske lijekove te  $\beta$ -blokatore. Među navedenim skupinama farmaceutika najviše zabrinjavaju antibiotici obzirom da njihova emisija u okoliš može prouzročiti razvoj rezistentnih bakterija, koje mogu dovesti do nepredvidivih posljedica.

Osim poželjnih utjecaja farmaceutika na ljudski i životinjski organizam, posljednjih desetljeća, točnije od 1976.godine kada su farmaceutici i njihovi razgradni produkti detektirani u tlu, podzemnim vodama, površinskim vodama i otpadnim vodama prati se njihov nepoželjni utjecaj na cjelokupni ekosustav [4].

Životinjske izlučevine su veliki izvor farmaceutika u okolišu jer većina farmaceutika koji se koriste u veterinarskoj medicini završava u gnojivu za poljoprivredna dobra. Prilikom raspršivanja i nanošenja gnojiva na poljoprivredne površine farmaceutici prisutni u gnojivu zbog svoje dobre topljivosti predstavljaju prijetnju podzemnim, površinskim te pitkim vodama.

Karakteristika farmaceutika koji dospijevaju u okoliš putem nepravilnog i nepropisnog odlaganja otpada, komunalnih voda, putem izlučevina, industrijskom proizvodnjom ili pak radi liječenja ovisi o brzini samog ispuštanja u okoliš te njegove razgradnje u oklišu [5]. Premda su koncentracije farmaceutika u okolišu uglavnom niske ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), raste zabrinutost zbog mogućeg dugoročnog utjecaja na zdravlje ljudi te kopnene i vodene ekosustave uslijed trajne izloženosti ovim spojevima [6]. Na **slici 1.** shematski su prikazani načini na koje farmaceutici dospijevaju u okoliš.



**Slika 1.** Shematski prikaz izvora unošenja farmaceutika u okoliš [7]

Nakon primjene, farmaceutik prolazi kroz različite metaboličke procese u živom organizmu pa često nastaju polarniji spojevi koji su samim time itopljiviji u vodi. Razgradnjom u organizmu nizom biokemijskih reakcija, farmaceutici se metaboliziraju i izlučuju kao osnovni spoj ili metabolit, odnosno njihova smjesa. Brojna istraživanja pokazala su da konvencionalni postupci obrade otpadnih voda nisu učinkoviti u uklanjanja velikog broja farmaceutika [8].

Metabolizam farmaceutika uključuje dvije vrste biokemijskih reakcija, a to su reakcije **I. faze** i reakcije **II. faze** koje se najčešće odvijaju jedna za drugom. Reakcije I. faze su kataboličke reakcije kao što su hidroliza, oksidacija ili redukcija, a produkti su im često kemijski reaktivniji te ponekad toksičniji i kancerogeniji od početnog farmaceutika. Reakcije II. faze su anaboličke (sintetičke) reakcije koje uključuju konjugaciju koja obično dovodi do stvaranja neaktivnog produkta. Reakcije I. faze obično služe za uvođenje reaktivne grupe u molekulu farmaceutika, kao što je hidroksilna grupa. Ta se funkcionalna grupaposlije u reakciji konjugacije zamijeni glukuronskom, sulfatnom ili acetilnom skupinom čime metabolit postaje dovoljno hidrofilan i topljiv u vodi kako bi se mogao izlučiti iz organizma putem urina .

Farmaceutski aktivne tvari nakon dospijevanja u okoliš zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava mogu se vezati za tlo i sediment, odnosno imaju tendenciju sorbiranja na krute matrice dok se spojevi topljivi u vodi razgrađuju abiotički (hidroliza, fotoliza, oksidacija, redukcija) ili biotički (bakterije, gljivice). Jedan od poželjnih procesa nakon što

farmaceutici dopiju u okoliš je biorazgradnja prilikom koje bakterije i gljivice razgrađuju organsku tvar do anorganskih soli, vode i ugljikovog dioksida pri aerobnim uvjetima. Mali broj antibiotika je podložan biorazgradnji, budući da bakterije i gljivice razgrađuju farmaceutike, a antibiotici su dizajnirani kako bi djelovali protiv bakterija pa razgradnja bakterijama ne vrijedi za tu skupinu [9].

Jedna od najvažnijih procesa abiotičke razgradnje u prirodnim vodama je hidroliza prilikom koje se složene molekule razgrađuju cijepanjem kovalentnih veza u reakciji s vodom te nastaju produkti koji se vežu s vodikovim i hidroksilnim ionom iz otopine, odnosno događa se ionizacija. Odvija se uz djelovanje kiselina, lužina ili enzima prema kemijskoj reakciji:



u kojoj HOH predstavlja vodu, AB ispitivani kemijski spoj, a A i B njegove kemijske skupine. Iako se smatra da je to najčešća kemijska reakcija kojom se farmaceutici razgrađuju u okolišu, vrlo je malo literaturnih podataka o njihovoj hidrolitičkoj stabilnosti [10].

Fotolitička razgradnja farmaceutika događa se ako isti nije podložan sorpciji i hidrolizi, već je osjetljiv na sunčevu svjetlost. Fotoliza ovisi o intenzitetu i valnoj duljini svjetlosti, pH-vrijednostima, tvrdoći vode, geografskoj širini, lokaciji, a ima značajan utjecaj u površinskim vodama [9].

Iako spadaju u tzv. “*nova zagađivala*”, farmaceutici su prisutni u okolišu od trenutaka kad su se počeli proizvoditi i koristiti. Njihova svojstva nakon ulaska u okoliš imaju negativne učinke na cjelokupni ekosustav pa tako i na čovjeka koji ih je i stvorio.

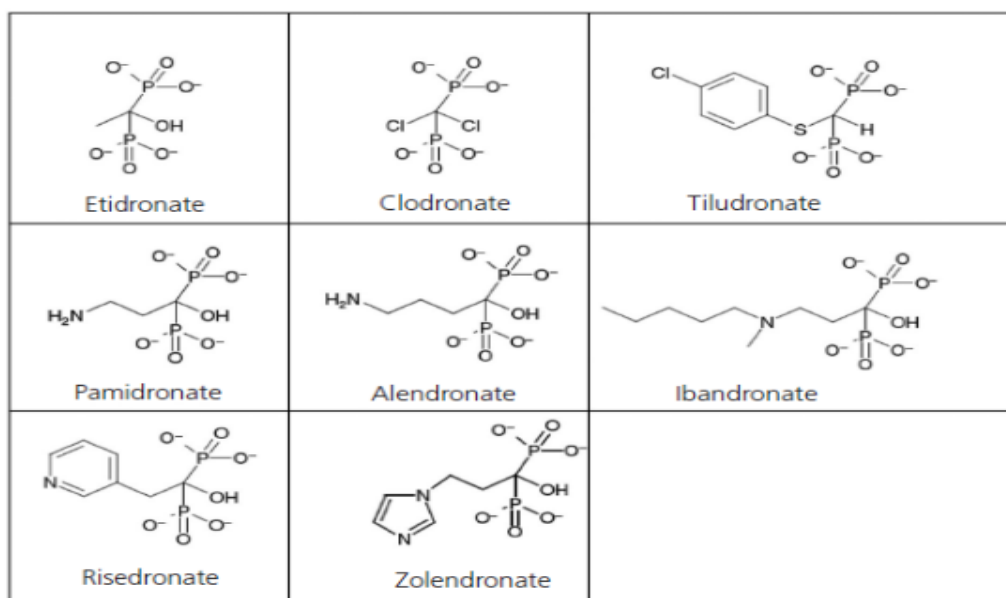
Analitička kemija kao znanstvena disciplina koja obuhvaća analizu i sintezu analitičkih mjerenja uz korištenje analitičkih metoda kako bi se dobile kvalitativne i kvantitativne informacije o analitu time se dobila informacija vrijedna za zaštitu okoliša. U središtu analitičkog istraživanja je uzorak u kojem se nalazi ukupna informacija, a analizom uzorka dobiva se mjerni signal koji je temeljen na fizikalnim i kemijskim zakonima. Odabirom metode te optimizacijom svih dijelova analitičkog procesa dobiva se ispravna odluka u procjeni kvalitete dobivenih postupaka i podataka. Cilj istraživanja farmaceutika u okolišu je odrediti samu sudbinu istih, razviti napredne analitičke metode za istovremeno određivanje farmaceutika i njihovih razgradnih produkata te procijeniti toksičnost na ekosustav i humani svijet. Iako se proizvode u iznimno velikim količinama i dalje nedostaju

podaci o prisutnosti farmaceutika u okolišu te njihovim učincima na okoliš, stoga je i više od velike važnosti dalje istraživati te proučavati ponašanje farmaceutika u okolišu.

### 3. Bisfosfonati

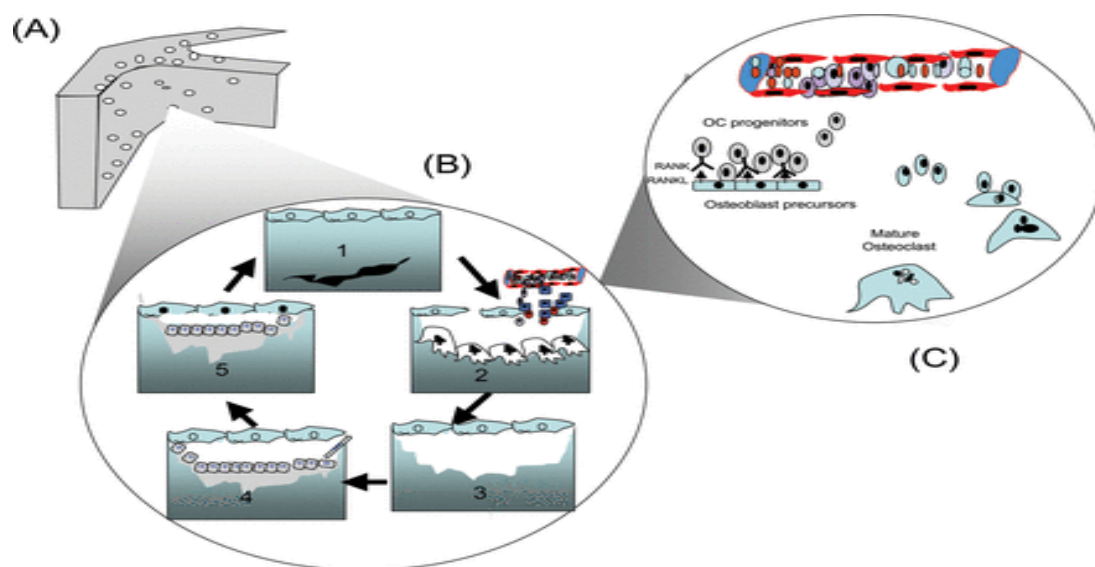
Bisfosfonati su antiresorptivni lijekovi koji služe za prevenciju prijeloma ili liječenje postmenopauzalne osteoporoze u žena, pravilno zacjeljenje bedrene i kosti zdjelice kao i intenzivno propadanje koštane mase kralješka. Obzirom na kemijski sastav, razlikuju se dvije glavne podskupine bisfosfonata: aminobisfosfonati i neaminobisfosfonati (alkilbisfosfonati). Prema redoslijedu pojavljivanja na tržištu dijele se na tri generacije:

- **Prva generacija** su neaminobisfosfonati, karakterizira ih kratki alkilni bočni lanac, a najvažniji predstavnici ove skupine koji su se do danas zadržali u kliničkoj primjeni su etidronat i klodronat.
- **Druga generacija** bisfosfonata uključuje aminobisfosfonate koji imaju terminalnu amino skupinu u pobočnom lancu. Svi bisfosfonati ove skupine nalaze se u kliničkoj primjeni, a najvažniji predstavnici su alendronati pamidronat.
- **Treća generacija** bisfosfonata također čine aminobisfosfonati, a atom dušika se nalazi u heterocikličkom prstenu kao kod risedronata i zoledronata ili u pobočnom lancu kao kod ibandronata prikazano na **slici 2**. [11].



**Slika 2.** Etidronatna, klodronatna, tiludronatna, pamidronatna, alendronatna, ibandronatna, risedronatna i zoledronatna kiselina [11]

Bisfosfonati utječu na koštanu pregradnju djelovanjem različitih mehanizama. Čvrsto se vežu za hidroksiapatit i sprečavaju njegovo otapanje, inhibiraju aktivaciju osteoklasta čime se smanjuje brzina koštane resorpcije te povećavaju diferencijaciju osteoblasta. Učinci bisfosfonata mogu se promatrati na tri razine: molekularnoj, tkivnoj i staničnoj vidljivo na **slici 3.** [13].



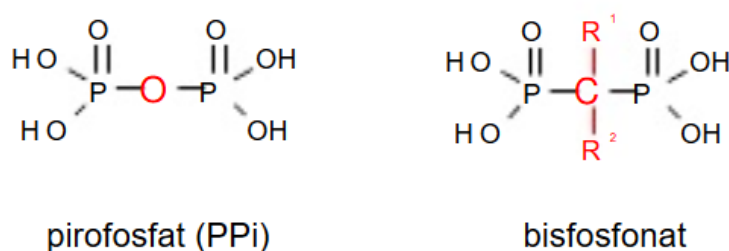
**Slika 3.** Učinak bisfosfonata na tkivnoj (A), staničnoj (B) i molekularnoj (C) razini

Bisfosfonati danas predstavljaju zlatni standard u liječenju osteoporoze, ali indikaciju za njihovu primjenu predstavljaju i druga brojna stanja, točnije različite bolesti koštanog sustava. Primjenjuju se kod Pagetove bolesti, osteogenesis imperfekte, fibrozne displazije, primarnog hiperparatireoidizma, multiplogamijeloma, hiperkalcijemije povezane s malignom bolešću, koštanih metastaza povezanih s karcinomima kao što su karcinom dojke u žena te karcinom prostate u muškaraca. Međutim, postoji razlika u njihovu uzimanju. Osteoporoza se liječi uobičajeno peroralnim uzimanjem bisfosfonata kroz duži period u malim dozama, dok se kod malignih i teških oboljenja oni apliciraju intravenski u mnogo višim dozama.

Neželjeni učinci pojedinog bisfosfonata ovise o brojnim čimbenicima kao što su njegov kemijski sastav, način primjene, doza i vrijeme trajanje terapije. Ipak, tri su najčešće zabilježene nuspojave: poremećaji probavnog sustava, nefrotoksičnost i reakcija akutne faze.

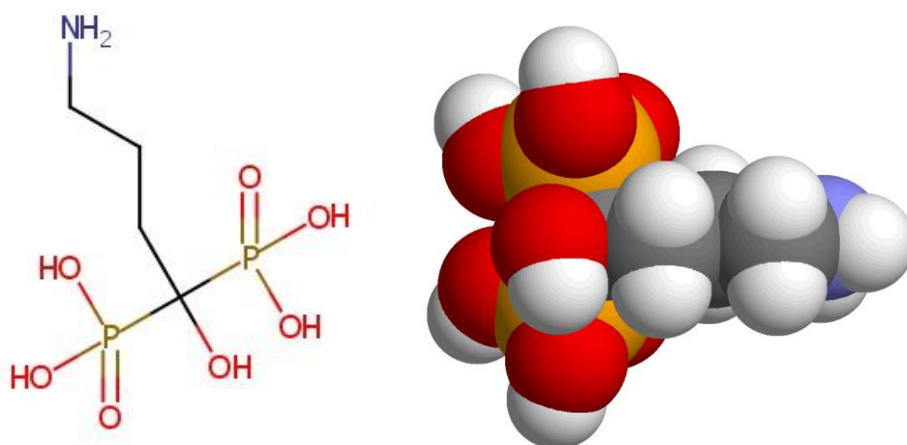
### 3.1. Alendronat

Jedan je od predstavnika bisfosfonata. Temeljna molekularna struktura bisfosfonata je pirofosfat, po strukturi fosfoanhidridni lanac P–O–P, koji je u staničnome vodenom mediju izrazito nestabilan, tj. podložan razgradnji hidrolizom. Bisfosfonati su analozi pirofosfata u kojem je središnji atom molekule ugljik (P–C–P). (**Slika 4**). Posljedica takve strukture je ta da bisfosfonati posjeduju različita fizikalno-kemijska svojstva kao što su postojanost u staničnom mediju, rezistenciju na hidrolizu, djelovanje pirofosfataze [16].



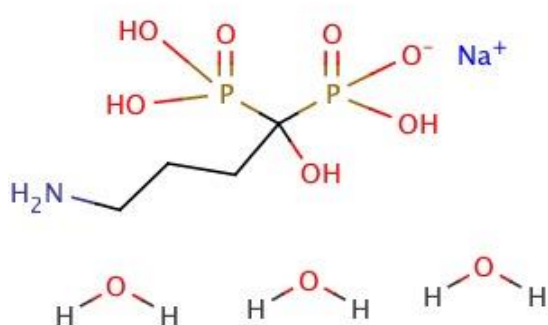
**Slika 4.** Pirofosfat i opća struktura bifosfonata [11]

Puni naziv alendronat prema IUPAC-nazivlju je 4-amino-1-hidroksi-1-fosfonobutil) fosfonatnakiselina, kemijske formule  $C_4H_{13}NO_7P_2$ , molekulske mase 249,096044 g/mol,  $pK_a=2,72$  (25 °C), CAS broj 66376-36-1. Na **slici 5**. prikazana je strukturna formula alendronata [17].



**Slika 5.** Kalotni model i strukturna formula alendronata  $C_4H_{13}NO_7P_2$  [18]

Alendronat se kao sol trihidrat nalazi u čvrstom kristalnom stanju kao bijela sol, nehigroskopna, empirijske formule  $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ . Karakterizira ga visoka polarnost te nedostatak UV apsorpcijskih kromofora koji omogućuju njegovo određivanje, pa upravo iz tog razloga literatura navodi fluorescentni detektor kao najbolje rješenje u njegovom određivanju. Alendronat je veoma topljiv u vodi, 1mg/L, slabo topljiv u alkoholu, a netopljiv u kloroformu [16].



**Slika 6.** Strukturna formula bijele čvrste kristalne soli trihidrataalendronata [18]

#### 4. Validacija

Analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Cilj svakog analitičkog mjerenja je dobiti pouzdane, točne i dosljedne podatke, odnosno vjerodostojne rezultate analize. U tu svrhu nužno je istražiti i opisati analitičke metode u onom obliku i opsegu kako bi se njenom primjenom dobili pouzdani i reprezentativni rezultati. Najbolji način izbjegavanja problema tijekom uporabe metode jest provođenje validacije analitičke metode. Iako se samom validacijom ne mogu predvidjeti svi problemi koji se mogu javljati tijekom primjene metode, postupci razvoja i validacije metode upućuju na one najčešće.

**Validacija** analitičkih metoda postupak je kojim dokazujemo da naša metoda služi svrsi, a zahtijeva je i regulativa i analitička profesija. Validirane metode u najvećoj će mjeri osigurati pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda. Za kvantitativne metode postupci validacije su različiti ovisno da li se



radi o metodi kojom određujemo analit prisutan u uzorku kao makrokomponenta ili je analit prisutni u tragovima u kompleksnoj matrici. Svakoj se metodi pristupa individualno, procjenjuje se što treba napraviti za dokaz svrhovitosti. Također, validacijom se mogu utvrditi uzroci mogućih problema tijekom izvedbe metode čime se postiže veliki stupanj pouzdanosti metode. Validacijom se dobiva validacijski izvještaj tj. dokument o provedenoj validaciji analitičke metode koji je obavezan dio registracijske dokumentacije nekog lijeka. Validacija se koristila i davno prije kod razvijanja metode iz jednostavnog razloga logike samog analitičara [18]. Struka, regulativa i zakonodavstvo prihvatili su sedam osnovnih parametara, tj. izvedbenih značajki validacije:

- *specifičnost /selektivnost*
- *linearnost*
- *preciznost (ponovljivost, međupreciznost, obnovljivost)*
- *točnost*
- *granica kvantifikacije*
- *granica detekcije*
- *robustnost (otpornost)*

Kombinacijom tih parametara oblikuje se plan validacije za svaku metodu[20].

#### **4.1. Specifičnost / selektivnost metode**

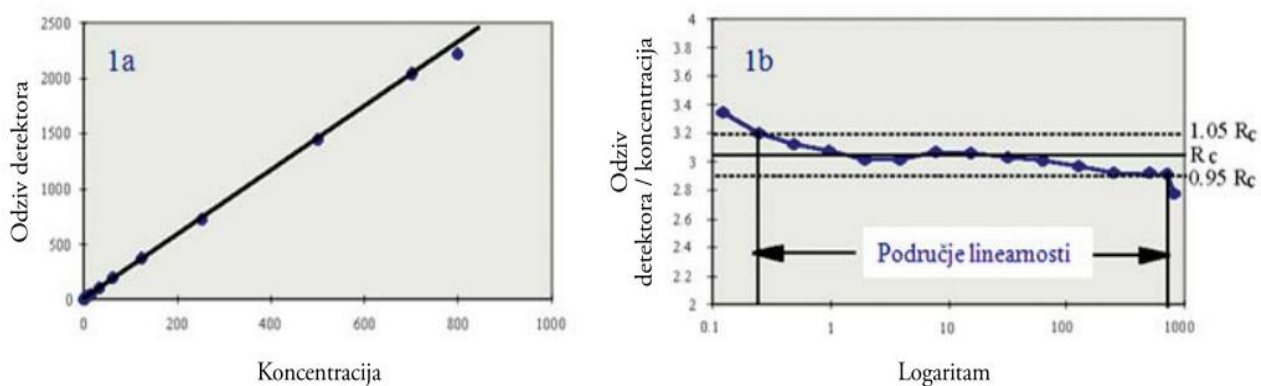
Ovim parametrima želimo dokazati da točno i specifično određujemo željeni analit u prisustvu drugih komponenti u uzorku. Primjenjuje se kod validacije svake analitičke metode, a način prikazivanja ovisi o karakteristikama metode koja se koristi u navedenu svrhu. Iako se u praksi poistovjećuju, *specifičnost* i *selektivnost* su dva različita svojstva metode. Specifičnom metodom određujemo samo jedan specifični analit, dok se selektivnom metodom može odrediti više komponenti istodobno, pod uvjetom da komponente međusobno ne smetaju jedna drugoj pri određivanju.

Kod kromatografskih metoda, osim usporedbe kromatograma referencijskog materijala i uzorka potrebno je dokumentirati parametre koje određuju simetriju i razdvojenost pikova, a kod određenih metoda prikupiti podatke o čistoći pikova. Selektivnost je nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda, a dokazuje se usporedbom odziva metode na referencijski materijal i analit u uzorku.

## 4.2. Linearnost

**Linearnost** se definirana kao mogućnost metode da unutar određenog ispitivanog područja daje ispitne rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva signala provedene metode pri različitim i poznatim koncentracijama referentnog materijala, pri čemu se preporučuje analizirati najmanje pet koncentracija uz tri uzastopna ponavljanja na temelju kojih se u konačnici uzima aritmetička sredina rezultata. Procjena linearnosti provodi se matematički i grafički. Matematički se, primjenom linearne regresijske analize, ovisnost koncentracije o odzivu instrumenta izražava jednadžbom pravca ( $y=ax+b$ ) i izračuna koeficijent determinacije ( $r^2$ ). Nagib pravca ( $a$ ) ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca ( $b$ ) predstavlja odziv instrumenta slijepog uzorka. Ukoliko oduzimanjem odziva instrumenta slijepog uzorka i dalje ostaje odsječak na ordinati to nam ukazuje na sustavnu pogrešku. Grafički prikazi ovisnosti signala tj. odziva detektora o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza, a to su:

- Grafička ovisnosti odziva detektora o koncentraciji standardnih otopina (**Slika 7.**)
- Grafički prikaz relativnih signala (omjer odziva detektorai odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi-x prikazano u log skali. Dobivena linija treba biti vodoravna u cijelome linearnom području, a područje linearnosti prestaje pri koncentracijama gdje linija relativnog odziva siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 %-tnoj ili 105 %-tnoj koncentraciji (**Slika 7.**)



**Slika 7.** Dva načina grafičkog prikaza linearnosti [21]

### 4.3. Preciznost

**Preciznost** se određuje kao izraz slaganja između mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima pa ovisno o uvjetima razlikujemo:

- **preciznost** pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko razdoblje između mjerenja
- **međupreciznost** je preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti)
- **preciznost pod uvjetima obnovljivosti** ili obnovljivost gdje promjenjivi uvjeti uključuju različite laboratorije, određuje se u svrhu normiranja metode i sastavni je dio validacije koju provodi sam laboratorij. Obnovljivost se određuje međulaboratorijskim usporedbama.

Eksperimentima preciznosti kvantificiraju se slučajne pogreške metode, a numerički je pokazatelj standardno odstupanje, koeficijent varijacije ili varijanca. Kod eksperimenata međupreciznosti iznimno je važno mjerenja koja se ponavljaju provoditi u uvjetima koji su što sličniji onima pri rutinskoj uporabi metode. Važno je naglasiti da se eksperimenti preciznosti rade na homogenom autentičnom uzorku, odnosno umjetno pripremljenom uzorku, a postupak se ponavlja prema propisu u metodi upravo onako kako će se ubuduće raditi u praksi. Broj ponavljanja treba zadovoljiti zahtjeve statistike. Najčešće se radi s minimalno pet ponavljanja na nekoliko koncentracija koje se, naravno, poklapaju s područjem linearnosti. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, matici uzorka i koncentraciji analita koji se određuje.

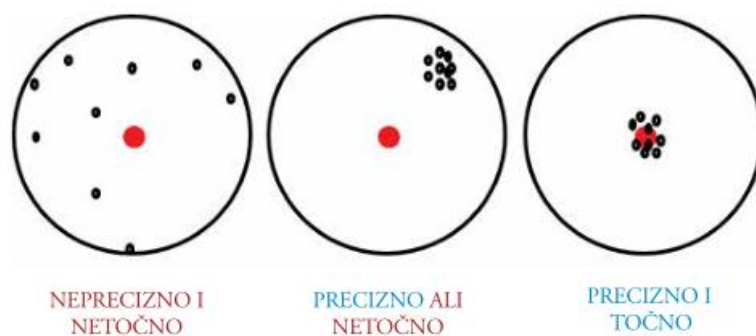
### 4.4. Točnost

**Točnost** je parametar koji se definira kao stupanj podudaranja između stvarne, referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena primjenjenim postupkom određeni broj puta. Numerički pokazatelj točnosti eksperimentalno je utvrđeno sustavno odstupanje metode, dobiveno kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti ili kao njihov odnos. Eksperimentalni pokazatelji se provode nakon određivanja selektivnosti, preciznosti i linearnosti, najmanje tri puta za tri koncentracijske razine raspoređene unutar radnog područja metode. Raspon koncentracija treba odgovarati stvarnom uzorku, ali treba uključiti i

koncentraciju na granici kvantifikacije kada je ona bitna. Točnost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- *usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim standardnom metodom*
- *analizom uzorka poznate koncentracije*
- *cijepljenjem matice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala(standardni dodataka)*

Rezultati se mogu prikazati grafički kao odnos teorijske vrijednosti prema izmjerenoj koncentraciji. Odnos točnosti i preciznosti prikazan je na **slici 8**.



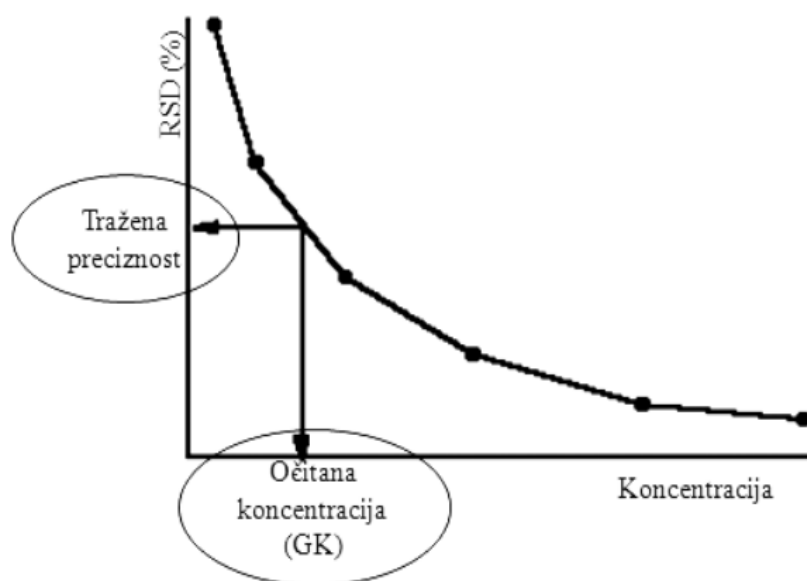
**Slika 8.** Shematski prikaz razlike između točnosti i preciznosti [20]

#### 4.5. Granice detekcije i kvantifikacije

**Granica detekcije**(eng. *limit of detection*, GD) odnosno **kvantifikacije** (eng. *limit of quantification*, GK) je najmanja količina analita koja se može detektirati odnosno kvantificirati uz odgovarajuću točnost i preciznost, a određuje se razrjeđivanjem osnovne otopine. Procjena može biti vizualna pomoću omjera signal/šum ili statistička. Vizualna procjena može se primjeniti kod instrumentalnih i neinstrumentalnih metoda, ali uglavnom za granicu detekcije gdje se procjenjuje najmanji signal koji se može prepoznati.

Ako se zahtijeva da metoda ima zadanu preciznost na granici kvantifikacije, pripremi se više uzoraka poznate koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije, svaki se

izmjeri 5–6 puta i izračuna se relativno standardno odstupanje (eng. *relative standard deviation*, RSD) za svaku koncentraciju. Zatim se grafički prikaže odnos RSD-a prema koncentraciji i iz grafa odredi koncentracija na granici kvantifikacije s točno određenom preciznošću kako je prikazano na **slici 9**. U praksi se obično pripremi uzorak tako određene koncentracije i potvrdi preciznost višekratnim mjerenjem. Parametar granice kvantifikacije iznimno je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš.

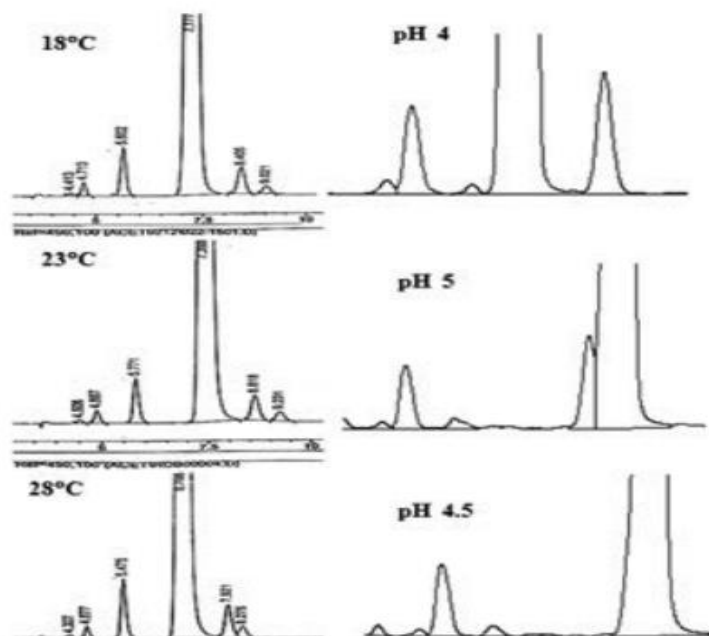


**Slika 9.** Određivanje granice kvantifikacije (GK) sa zadanom preciznošću [21]

#### 4.6. Robustnost

**Robustnost** se određuje kao mjera otpora analitičkog postupka na namjerne male promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje se provodi kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metoda utječu na rezultat analize te predstavljaju važan dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode i upućuju što treba nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata. Na primjer kod tekućinske kromatografije ispituju se utjecaji sastava i pH pokretne faze, temperature, protoka te različite šarže ili dobavljača kolona. Stabilnost otopine također je tipičan parametar ispitivanja robusnosti metode. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Uvjete za koje je utvrđeno da utječu na rezultat treba držati pod nadzorom i to jasno

naznačiti u opisu metode. Primjeri utjecaja promjene parametara temperature kolone i pH-vrijednosti pokretne faze prikazani su na **slici 10**. Prema podacima o robusnosti postavljaju se parametri za ispitivanje prikladnosti sustava.



**Slika 10.** Otpornost metode – utjecaj temperature kolone i pH pokretne faze [21]

Pri provedbi validacije nije potrebno za svaku metodu odrediti sve parametre. Njihov odabir ovisi o namjeni metode, kako što je to prikazano u **tablici 1**. Razumijevanje značenja pojedinih parametara i načina na koji se izvode u laboratoriju, poznavanje značajka metode i regulatornih zahtjeva osnova su za postavljanje kriterija prihvatljivosti za svaki parametar, što je također neizostavni dio validacije. Postavljeni kriteriji uspoređuju se s dobivenim rezultatima eksperimenata, a zadnji je korak validacije pisanje izvješća s jasno naznačenim zaključkom o potvrdi da metoda odgovara namijenjenoj svrsi [22].

**Tablica 1.**Validacijski parametri za validaciju analitičkih metoda različitih namjena [21]

Analiza tragova				
	Kvalitativna	Kvantitativna	Limit test	Sadržaj
<b>Istinitost</b>	ne	da	ne	da
<b>Preciznost</b>	-	-	-	-
<b>Ponovljivost</b>	ne	da	ne	da
<b>Međupreciznost</b>	ne	da	ne	da
<b>Selektivnost</b>	da	da	da	da
<b>GD</b>	ne	ne	da	ne
<b>GK</b>	ne	da	ne	ne
<b>Linearnost</b>	ne	da	ne	da
<b>Područje</b>	ne	da	ne	da

## 5. Metode određivanja alendronata

Složene analitičke metode određivanja farmaceutika u okolišu odnedavno se razvijaju i poboljšavaju, a posljedica napretka u razvoju metoda i moderne analitičke instrumentacije je da su farmaceutici detektirani u okolišu u vrlo niskim koncentracijama. Analitičke metode koje se najčešće primjenjuju u analizi okoliša u svrhu određivanja farmaceutika su kromatografske metode vezane s različitim detektorima, detektorom s nizom dioda, fluorescentnim detektorom te spektrometrom masa.

**Kromatografija** je složena analitička metoda odjeljivanja i analiziranja tvari koja se zasniva na različitoj sorpciji sastojaka na prikladnom sorbensu. Temelji se na različitim brzinama putovanja sastojaka kroz sustav koji se sastoji od pokretne i nepokretne faze. Različite molekule imaju različit afinitet prema nepokretnoj fazi i upravo zbog tog dolazi do odjeljivanja sastojaka smjese. Analiti koji stupaju u jaču interakciju s nepokretnom fazom trebat će više vremena da prođu kroz sustav nego oni sa slabijom interakcijom. Ove interakcije su obično kemijske prirode, ali u nekim slučajevima prisutne su i fizikalne interakcije. Kromatografske metode se dijele prema agregatnom stanju faza, izvedbenoj tehnici te mehanizmu separacije.

### **Podjela s obzirom na ravnotežu između pokretne i nepokretne faze:**

- *razdjelna kromatografija* (tekuća nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač)
- *adsorpcijska kromatografija* (nepokretna faza je adsorbens, a pokretna tekućina)
- *afinitetna kromatografija* (na površini čvrste faze nalaze se različite funkcijske skupine)
- *kromatografija isključenjem* (nepokretna faza s porama i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima.)
- *ionska kromatografija* (nepokretna faza je ionski izmjenjivač)

### **Na temelju sastava pokretne faze:**

- *plinska kromatografija*
- *tekućinska kromatografija*
- *fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima*

### **Na temelju izvedbene tehnike:**

- *plošna kromatografija* (tankoslojna kromatografija, kromatografija na papiru)
- *kromatografija na stupcu ili u koloni*

Potrebno je definirati nekoliko parametara koji su bitni za kvalitetu raspodjele analiziranog uzorka:

- *vrijeme zadržavanja ( $t_R$ )*- vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru smještenog na izlasku iz kromatografske kolone

$$t_R = t_m + t_{R''} \quad (1)$$

gdje je  $t_{R''}$  vrijeme zadržavanja koje otopljena tvar provede vezana za nepokretnu fazu, a  $t_m$  mrtvo vrijeme zadržavanja, odnosno vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz nju.

Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze.



- *koeficijent selektivnosti ( $\alpha$ )*- pokazuje moć odjeljivanja sastojaka na koloni, ( $\alpha > 1$ )

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \quad (2)$$

- *faktor razlučivanja ( $R_s$ )*- kvantitativna mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dva analita na koloni.

$$R_s = \frac{2 * [t_{RB} - t_{RA}]}{w_A + w_B} \quad (3)$$

gdje je  $t_{RB}$  vrijeme zadržavanja jedne komponente,  $t_{RA}$  druge, a  $w_A$  i  $w_B$  su bazne širine pikova prve i druge komponente[29].

- *faktor kapaciteta ( $k$ )*-opisuje brzinu kretanja analita u koloni

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (4)$$

## 5.1. Tekućinskakromatografija (LC)

Tekućinska kromatografija je jedna od najčešće korištenih analitičkih separacijskih tehnika. Omogućuje uspješno razdvajanje širokog raspona molekula kao što su proteini, polimeri, male molekule farmaceutika ili njihovih metabolite za razliku od drugih separacijskih tehnika koje nisu pogodne za razdvajanje termički nestabilnih molekula [24].

Tekućinska kromatografija dijeli se još i prema kromatografskom sustavu na *kromatografiju normalnih* i *kromatografiju obratnih faza*. Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna, dok je pokretna faza nepolarna gdje odjeljivanje ovisi o interakciji polarnog analita s nepokretnom fazom koja je najčešće silikagel. Kod kromatografije obratnih faza pokretna faza je polarna (silikagel) dok odjeljivanje ovisi o hidrofobnosti ili lipofilnosti analita.

Pokretna faza može biti voda, pufera, organsko otapalo (npr. metanol, acetonitril...) ili smjesa otapala, a bitno je da bude visoke čistoće. Eluiranje pokretnom fazom može biti izokratno (sastav pokretne faze je cijelo vrijeme isti) ili gradijentno (sastav pokretne faze se

mijenja tijekom kromatografskog procesa). Kod gradijentnog eluiranja otapala se moraju potpuno miješati prije ulaska u kolonu. Zbog različitih svojstava otapala može doći do razvijanja plinova pa postoje odjeljci za miješanje i degaziranje [21].

### **5.1.1. Tekućinskakromatografija visoke djelotvornosti**

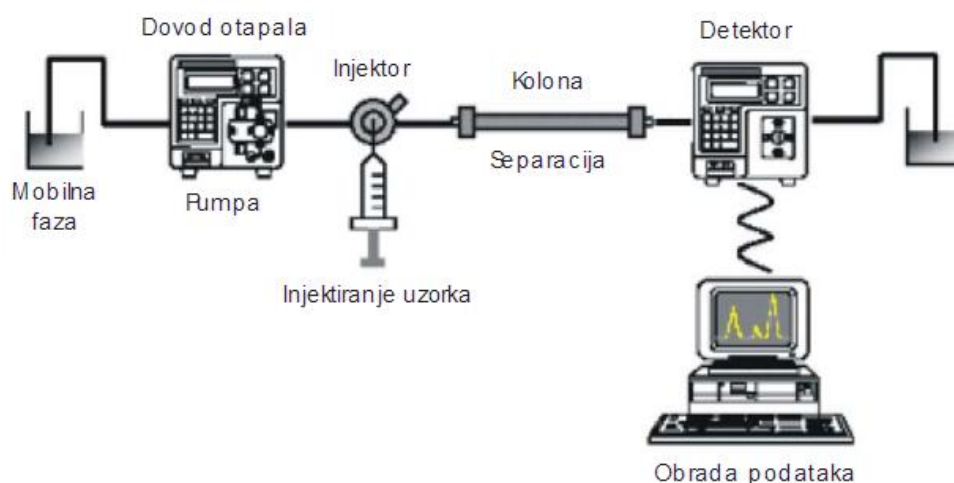
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je suvremena analitička tehnika, najrazvijeniji oblik kromatografije koja pripada kromatografiji na stupcu, a koristi se za razdvajanje komponenti smjese na osnovi kemijsko-fizikalnih interakcija između ispitivanog analita i tekuće pokretne faze i nepokretne faze u stupcu, a pogodna je za nisko hlapljive i spojeve nestabilne pri visokim temperaturama. U usporedbi s klasičnim kromatografskim tehnikama, HPLC tehniku karakteriziraju sljedeća svojstva:

- mali promjer čestica punila (3-50  $\mu\text{m}$ )
- relativno visoki radni tlakovi
- kontrolirani protok pokretne faze
- mali promjer kolone i mogućnost višekratnog korištenja kolone
- precizno injektiranje malih volumena uzorka
- osjetljivi detektori za detekciju malih količina analita
- automatizirani i standardizirani instrumenti
- brza analiza
- visoki stupanj razdvajanja

Princip rada HPLC-a je sljedeći: prolazak analizirane tvari ili smjese tvari kroz kromatografsku kolonu punjenu nepokretnom fazom, događa se pumpanjem pokretne faze, otapala pod visokim tlakom. U sustav se injektira mali volumen uzorka u tok pokretne faze koja onda dolazi do kolone. Srce kromatografskog sustava je kromatografska kolona na kojoj dolazi do odjeljivanja sastojaka ispitnog uzorka. U kromatografskoj koloni smještena je nepokretna faza na kojoj dolazi do odijeljivanja sastojaka ispitnog uzorka. Dolazi do različitog zadržavanja komponenti smjese zbog različitih, specifičnih interakcija. Kako bi molekula prešla iz jedne faze u drugu mora savladati energetska barijeru, a za to je potrebna energija. Molekule u pokretnoj fazi lakše svladavaju energetska barijeru jer je veza između molekule i pokretne faze obično slabija u odnosu na vezu s nepokretnom fazom. Poboljšavanje razdvajanja kontrolira se promjenom sastava pokretne faze, temperature ili

protoka pokretne faze. Ako je temperatura viša kinetički parametri su bolji, a s tim se povećava difuzivnost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze. Učinkovitost kolone ovisi o temperaturi i radnom tlaku, promjeru čestica punjena, duljini kolone. Kako bi se ostvario konstantan protok pokretne faze kroz čestice vrlo malog promjera potrebni su visoki tlakovi što se omogućuje crpkom. Nakon odjeljivanja sastojaka uzorka nakromatografskoj koloni slijedi dokazivanje na detektoru te prikaz kromatograma na ekranu računala. Nakon prolaska kroz kolonu uzorak dolazi na detektor koji prati svojstva uzorka, pa je moguće i kvantitativno i kvalitativno odrediti ispitivane analite [23].

Glavne komponente svakog uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su spremnik pokretne faze, pumpa, injektor, kolona, detektor te računalo za prikaz podataka. Shema uređaja prikazana je na **slici 11**.



**Slika 11.** Shematski prikaz HPLC uređaja [5]

*Spremnik pokretne faze* omogućuje skladištenje dovoljnog volumena otapala za kontinuirani rad sustava (minimalno 500 mL). Cjevčica koja povezuje spremnik i crpku trebala bi imati filter kako bi se spriječilo unošenje čestica iz spremniku u crpku.

*Pumpa* omogućuje konstantan i kontinuiran protok pokretne faze kroz sustav. Budući da vrlo male čestice u kromatografskoj koloni pružaju otpor pokretnoj fazi potrebne su pumpe koje rade pri visokim tlakovima. U HPLC sustavima se uobičajeno koriste pumpe s konstantnim protokom. Pokretna faza najčešće je kombinacija dva ili više otapala u različitom omjeru pa pumpe omogućuju njihovo kontrolirano miješanje.

*Injektor* automatski unosi uzorak u struju pokretne faze prije samog ulaska u kromatografsku kolonu.

*Kromatografsku kolonu* predstavlja metalna cijev unutar koje je smještena nepokretna faza. Dimenzije kromatografske kolone mogu biti različite: 100 – 250 mm duljine, 2,1 – 4,6 mm unutrašnjeg promjera te 3 – 5  $\mu\text{m}$  promjera čestica [23].

*Detektor* je zadnji dio uređaja, a služi za mjerenje promjena svojstava pokretne faze ili specifičnog svojstva analita.

Snimanje podataka je moguće pomoću računalnog programa koji upravlja cijelim HPLC sustav, prikuplja i obrađuje dobivene podatke [24].

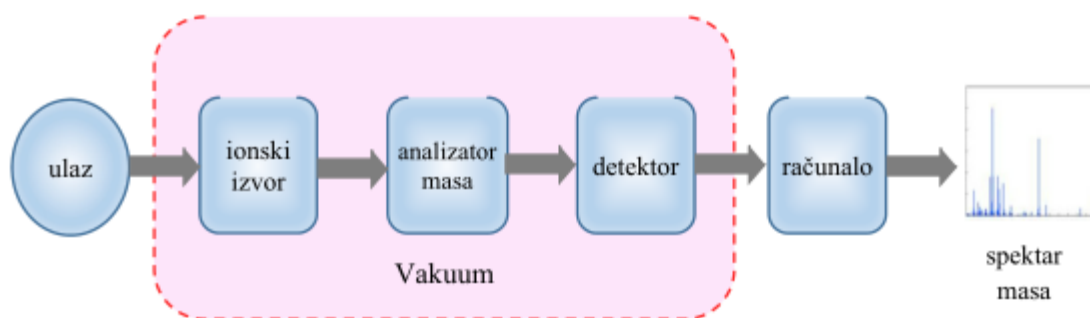
### **5.1.2. Kromatografija ionskih parova**

HPLC obrnutih faza je u pravilu metoda koja se prva primjenjuje kada se rješava neki novi analitički problem. Uobičajena nepokretna faza je  $\text{C}_{18}$ , a zadržavanje tvari i selektivnost podešavaju se variranjem sastava pokretne faze. Ukoliko izokratno eluiranje ne dovodi do željenog odjeljivanja primjenjuje se gradijentno eluiranje. Kod izokratnog eluiranja pokretna faza ima isti sastav tijekom cijele analize. Međutim, nije uvijek moguće postići zadovoljavajuću separaciju primjenom izokratnog eluiranja. Tada se primjenjuje gradijentno eluiranje, odnosno sastav pokretne faze se mijenja tijekom analize. Učinak gradijenta otapala u HPLC može se usporediti s temperaturnim gradijentom u GC.

Moć eluiranja pokretne faze može se modificirati variranjem pH ili dodavanjem reagenasa koji tvore ionske parove s ionom u otopini (kromatografija ionskih parova). U oba slučaja nastoje se stvoriti neutralne kemijske vrste u pokretnoj fazi koje stupaju u interakciju s nepolarnom nepokretnom fazom. Kako bi se promijenila polarnost analita i povećala osjetljivost dokazivanja, analit je potrebno derivatizirati. Enantiomere je moguće odijeliti primjenom kiralnih faza, obično se u tu svrhu koristi silika gel kao nosač koji je prevučen polimerom na koji je kemijski vezan optički aktivni polimer. Npr. za odjeljivanje enantiomera aminokiselina koristi se kiralna faza dobivena iz optički aktivnog  $\text{Cu(II)}$ -L-prolin kompleksa [24].

## 5.2. Spektrometrija masa

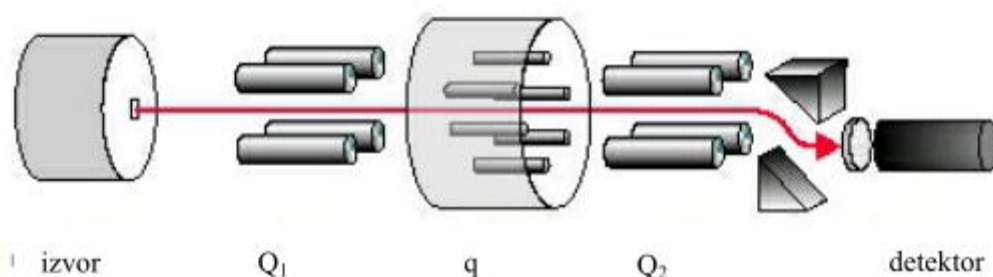
Spektrometrija masa (eng, *massspectrometry*, MS) je analitička tehnika koja omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu organskih i anorganskih tvari, spojeva i smjese spojeva. Prednosti MS-a su niska granica dokazivanja, dobra ponovljivost i mogućnost odvajanja pozadinskog signala (interferencija) od željenog analita. U spektrometru masa neutralne molekule se nabijaju, razdvajaju prema omjeru mase/naboja ( $m/z$ ) i zatim se detektiraju. Grafički prikaz rezultata analize je intenzitet u ovisnosti o  $m/z$  omjeru. Spektrometar masa se sastoji od injektora, vakuumskog sustava u kojem je izvor iona, jednog ili više analizatora i sustava za prikupljanje i detekciju iona. Uzorak se injektira u zagrijani spremnik. Tekući uzorak se uparava, čvrsti uzorak ako nije podložan raspadanju injektira se direktno, a plinovi se ne moraju zagrijavati. Upareni uzorak se ionizira, razdvaja i dolazi na detektor. Nakon toga slijedi računalna obrada podataka kako bi se dobile željene informacije. Shema uređaja prikazana je na **slici 12.** [24].



**Slika 12.** Shematski prikaz spektrometra masa [5]

Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa su kao dvije složene analitičke tehnike do prije dvadesetak godina bile potpuno odvojene tehnike, no s vremenom, točnije osamdesetih godina prošlog stoljeća, došlo je do povezivanja LC iMS tehnika u vezani sustav na područjima desorpcije, ionizacije analita u tekućoj fazi što je predstavilo golem iskorak u upotrebi vezanog sustava, odnosno u proučavanju i određivanju različitih molekula. Navedenom vezanom analizom moguće je odrediti ionske strukture, energetske i kinetičke interakcije iona s plinovima, fotonima, elektronima i ionima. Prednost ove vezane tehnike su velika osjetljivost, pouzdana kvantifikacija analita pri niskim koncentracijama, detaljna kontrola uvjeta u analizi, smanjen broj koraka pripreme uzorka te poboljšana separacija [24].

Tijekom HPLC-MS analize ovisno o spojevima koji se analiziraju koriste se različiti analizatori masa, a najčešći je kvadripol (**slika 13.**) koji se sastoji od četiri paralelne elektrode u obliku valjka od kojih su dvije pozitivnog, a dvije negativnog naboja. Ioni se razdvajaju na temelju stabilnosti njihove putanje u oscilirajućem električnom polju. Kvadripoli se vrlo često spajaju u seriju, tzv. trostruki kvadripolni spektrometar masa, tako da se prvi ( $Q_1$ ) i treći ( $Q_2$ ) kvadripol koriste kao filtri masa, dok drugi kvadripol( $q$ ) djeluje kao reakcijska zona. To je zapravo ćelija ispunjena inertnim plinom u kojoj dolazi do sudara molekula plina i iona uzorka što rezultira njihovom fragmentacijom. Kvadripol  $Q_1$  može djelovati pod stalnim električnim poljem pri čemu propušta ione u određenom rasponu omjera  $m/z$  [24].



**Slika 13.** Shematski prikaz trostrukog kvadripolnog spektrometra masa [5]

### 5.3. Fluorescentni detektor

Svaki detektor mjeri promjenu određene fizikalne veličine koja uzrokuje prolaz ispitivane tvari kroz mjerno-protočnu ćeliju detektora.

Bitni parametri koje mora zadovoljavati jedan detektor:

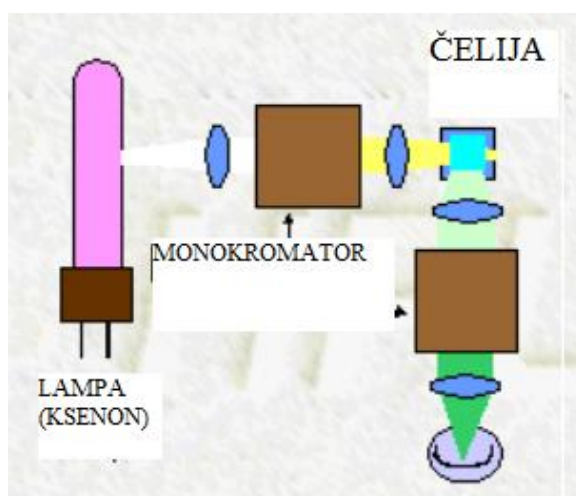
- mali pomak i šum kod snimanja bazne linije
- visoka osjetljivost
- brzi odziv
- široko linearno dinamičko područje rada
- mali „mrtvi“ volumen
- dizajn protočnih ćelija detektora koje će sprječavati miješanje separiranih analita

- neosjetljivost na promjenu vrste otapala, protoka i temperature
- jednostavno i pouzdano rukovanje
- podesivi, tako da se mogu optimirati za različite spojeve
- nedestruktivni prema uzorku

Fluorescentnim detektorom mogu se postići niske granice dokazivanja ali u nekim slučajevima potrebno je provesti derivatizaciju kako bi se poboljšala fluorescentna svojstva analita. Fluorescentni detektor jedan je od najosjetljivijih detektora koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti. Osjetljivost ovog detektora je čak 10 do 1000 puta veća od UV detektora, veoma specifičan i selektivan, koristi se za analiziranje tvari koje imaju fluorescentna svojstva. Fluorescencija se može koristiti za selektivnu detekciju bilo koje supstance koja apsorbira ili emitira svjetlo pri odabranom setu ekscitacijskih ili emisijskih valnih duljina. Otkrivanje bilo koje komponente znatno ovisi o odabranoj valnoj duljini, no prednost modernih detektora omogućava brzu promjenu valnih duljina emisije i ekscitacije što nudi mogućnost otkrivanja svih komponenti u smjesi. Na **slici 14.** shematski je prikazan fluorescentni detektor [25].

Često se koristi za pretkolonsku ili postkolonsku derivatizaciju. Tipične primjene:

- lijekovi
- aditivi za hranu
- zagađivači okoliša
- bilo koja supstanca koja se može prevesti u fluorescirajući derivat (alkoholi, amini, aminokiseline i protein)



**Slika 14.** Shematski prikaz fluorescentnog detektora [25]

Princip rada fluorescentnog detektora zasniva se na prolasku svjetlosti kroz filter ili monokromator te sudara s uzorkom. Određena količina upadne svjetlosti apsorbirana je uzorkom, te emitirana kao pojava fluorescencije. Fluorescentno svjetlo prolazi kroz monokromator do detektora pod kutem od 90°. Fluorescentno svjetlo emitira se u svim područjima.

#### **5.4. Literaturni pregled kromatografskih metoda određivanja alendronata**

Iako se alendronat koristi u znatnim količinama, prema dostupnoj literaturi ne postoji metoda njegova određivanja u uzorcima iz okoliša. Stoga, objavljene metode odnose se na određivanje alendronata u uzorcima ljudske plazme i ljudskog urina.

Alendronat spada u skupinu bisfosfonata čija su glavna svojstva da su izrazito polarni i nemaju kromofora. Zbog tih svojstava vrlo ih je teško kromatografski razdvojiti i detektirati koristeći standardne kromatografske tehnike. Također imaju nekoliko  $pK_a$  vrijednosti čije se vrijednosti protežu kroz cijeli pH raspon tako da je teško postići da postoji jedna ionska vrsta tijekom kromatografske analize tekućinskom kromatografijom. Primjena plinske kromatografije je nemoguća jer nisu hlapljivi i izrazito su polarni. Iz navedenih razloga većina analiza rađene su kapilarnom elektroforezom, ionskom kromatografijom te kromatografijom ionskih parova (engl. *ion-pair chromatography*) [16, 29]. Kada se govori o tekućinskoj kromatografiji u većini slučajeva radi se o pred- ili post-kolonskoj derivatizaciji. Derivatizacija se koristi iznimno u slučajevima kada je analit izrazito teško analizirati jer se unosi još jedan korak u analitički postupak. Tijekom postupka derivatizacije analit se prevodi u oblik koji je moguće bolje separirati ili detektirati s većom osjetljivošću [26].

Tekućinska kromatografija je izrazito raširena analitička tehnika koja se koristi za određivanje analita različitih svojstava. Koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) zajedno sa spektrometrijom masa moguće je postići izrazito niske granice određivanja. Kod analize alendronata HPLC-MS tehnikom potrebno je upariti alendronat s odgovarajućim reagensom da bi se novonastali spoj dovoljno dugo zadržao na koloni i naknadno detektirao na spektrometru masa. Kao reagensi za uparivanje mogu se koristiti n-butilamin, trifluorooctena kiselina, trietilamin, također i razni dikationski i trikationski reagensi [15].



U **tablici 2.** prikazani su eksperimentalni uvjeti određivanja alendronata vezanom tehnikom tekućinska kromatografija- spektrometrija masa te odgovarajući reagensi za uparivanje. Kao nepokretna faza korištena je reverzna faza C<sub>18</sub> što je ujedno i najčešće korištena nepokretna faza u HPLC analizama. Za pokretnu fazu korištena je smjesa vodene i organske faze. Kao vodena faza služile su kiseline zbog što bolje ionizacije na spektrometru masa. Za organsku fazu korišten je acetonitril jer se njegovim korištenjem postižu kromatografske krivulje zadovoljavajućeg oblika.

**Tablica 2.** Parametri određivanja alendronata spektrometrijom masa

Literatura	Nepokretna faza	Pokretna faza	Tip spektrometra masa	Način ionizacije	Reagens	m/z
<b>27</b>	C <sub>18</sub>	ACN/ mravlja kiselina	MS/MS	ionizacija elektroaspršenjem (ESI)	n-amil- amin	303
<b>29</b>	C <sub>18</sub>	ACN/ octena kiselina	MS/MS	ionizacija elektroaspršenjem (ESI)	FMOC	331

Unatoč poteškoćama koje se mogu javiti kod analize alendronata moguće je postići zadovoljavajuće rezultate koristeći fluorescentni detektor i na taj način koristeći njegove glavne prednosti, postići niske granice određivanja. Prije detekcije fluorescentnim detektorom potrebno je alendronat derivatizirati i tako dobiti spoj koji fluorescira.

U **tablici 3.** prikazani su eksperimentalni uvjeti određivanjem alendronata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom. Prilikom ovih analiza najčešće korištena nepokretna faza je C<sub>18</sub> zbog svojstava koja su primjenjiva za različite vrste spojeva. Nepokretna faza je smjesa vodene i organske faze i to kiseline i acetonitrila. Koristeći različite reagense za uparivanje iona, kao npr. FMOC (fluormetil-karbonil), ili neki drugi organski spoj, dobivaju se različite valne duljine pobuđivanja i emisije u uzorcima ljudskog urina.

**Tablica 3.** Parametri određivanja alendronata fluorescentnim detektorom

Literatura	Nepokretna faza	Pokretna faza	Valna duljina pobuđivanja, nm	Valna duljina emisije, nm	Reagens
27	SDB	ACN/PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	333	445	n-amil-amid
28	C <sub>18</sub>	ACN/limunska kiselina	420	490	NITC
29	HSC <sub>18</sub>	ACN/mravlja kiselina	260	310	FMOF

Validacijom razvijenih analitičkih metoda određene su izvedbene značajke: linearnost, granica kvantifikacije i detekcije, preciznost i točnost.

U **tablici 4.** prikazani su parametri validacije dobiveni različitim metodama. Postignute vrijednosti validacijskih parametara pokazuju da su metode uspješno razvijene za određivanje alendronata. Najniže granice detekcije i kvantifikacije postignute su za metodu koja se razvijala s čistim standardima što je i očekivano. No, granice detekcije i kvantifikacije za metode koje određuju alendronat u izlučevinama su zadovoljavajuće jer se nalaze u niskom koncentracijskom području (µg/L). Također, može se zaključiti da nema velike razlike u vrijednostima validacijskih parametara za različite detektore. Na temelju pokazanih validacijskih parametara može se zaključiti da se i spektrometar masa i fluorescentni detektor mogu uspješno koristiti za analizu alendronata.

**Tablica 4.** Parametri validacije određivanja alendronata HPLC-MS i HPLC-FLD metodom

Literatura	Tehnika određivanja	Linearnost, µg/L	GK, µg/L	GD, µg/L	Preciznost, %	Točnost, %	Matica
17	LC-MS-MS	2-25	0,2	0,07	4,85	11,2	-
27	HPLC-MS	14-60	16	0,2	1,6	98,6	Urin
27	HPLC-FLD	2-32	2	0,2	1,86	92,9	Urin
28	HPLC-FLD	5-100	1	0,1	-	102,57	Ljudska plazma

## 6. Zaključak

Farmaceutici u okolišu predstavljaju veliki problem koji prijeti okolišu te živim bićima. Jedan od predstavnika farmaceutika, alendronat, koji se ubraja u skupinu bisfosfonata, svakodnevno se koristi za liječenje i prevenciju od osteoporoze. Kemijski gledano, to je polaran kemijski spoj koji se vrlo dobro otapa u vodi i time potiče svoju razgradnju nakon što dospije u okoliš.

Istraživajući literaturu i znanstvene izvore pronađeno je da se alendronat može uspješno analizirati koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti uz različite detektore. Prvenstveno zbog velike polarnosti i nedostatka kromofora potrebno je uvesti korak derivatizacije. Prije kromatografske analize uz primjenu spektrometra masa korišteni su različiti reagensi za uparivanje iona koji s alendronatom stvaraju spoj koji je mogao biti zadovoljavajuće kromatografski zadržan i naknadno detektiran spektrometrom masa. Također, korišten je i fluorescentni detektor koji uz prethodnu derivatizaciju alendronata dovodi do spoja koji fluorescira.

Nepokretna faza koja je uspješno korištena je reverzna faza C<sub>18</sub>, a kao pokretna faza korištena je smjesa vodene (različite kiseline) i organske faze (acetonitril).

Validacijski parametri pokazali su da sve navedene metode daju granice određivanja u niskom koncentracijskom području (µg/L). Time je pokazano da se korištenjem tekućinske kromatografije mogu analizirati i odrediti izrazito zahtjevni spojevi poput alendronata.

## 7. Literatura

1. Ž. Kondić, V. Kondić, Okoliš i norma ISO 14000 – primjena, Konzalting usluge, Čakovec, 2009.
2. Bio Intelligence Service, Study on the environmental risks of medicinal products, Final report, Executive Agency for Health and Consumers, 2013., str. 56-93
3. H. S. Dolliver, Fate and Transport of Veterinary Antibiotics in the Environment, UMI, Minnesota, 2007., str. 8-11
4. W. Garrison, J. D. Pope, F. R. Allen, GC/MS analysis of organic compounds in domestic waste waters, uL. H. Keith (ur.), Identification and analysis of organic pollutants in water. Ann Arbor Science Publishers Inc, Ann.Arbor, 1976, str. 517–556
5. M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
6. K. Kummerer, Pharmaceuticals in the Environmet, Springer, Berlin, 2008., str. 3-14.
7. <http://ehp.niehs.nih.gov/1104477/>, srpanj 2016.
8. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, pregledni članak, Zagreb, 2016.
9. K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment, *Chemosphere*, 75 (2009) 417-434.
10. Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu, *Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China*, *Journal of Hazardous Materials* 262 (2013) 189-131
12. M. Favus, Bisphosphonates for Osteoporosis, *N. Engl J. Med* 30 (2010) 288-96
13. G. A. Rodan, A. A. Reszka, Bisphosphonate Mechanism of action, *Current Molecular Medicine*, 5 (2003) 65-74

14. G. Ficcaro, F. Beninati, I. Rubino, A. Vannucchi, G. Longo, P. Tonelli, G. P. Prato. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment, *J Clin Periodontol* 32(2005) 1123-8
15. L. Bencarić, Registar lijekova u Hrvatskoj, Udruga poslodavaca u zdravstvu, Zagreb, 2013.
16. M. M. Warnke, Z. Breitbach, E. Dodbiba, J. A. Crank, T. Payagala, P. Sharma, E. Wanigesekara, X. Zhang, D. W. Armstrong, Positive mode electrospray ionization mass spectrometry of bisphosphonates using indication ion-pairing agents, *Analytica Chimica Acta*, 633 (2009) 232-237
17. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00257a001>, kolovoz 2016.
18. <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=alendronate&source=fp>, srpanj 2016.
19. <http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=9211>, kolovoz 2016.
20. International Committee for Harmonisation ICH – Guidance for Industry Q2 (R1) – Validation of Analytical Procedures – Methodology, 2011.
21. C. M. Riley, T. W. Rosanske, Development and validation of analytical methods, Pergamon 2005.
22. V. Gašljević, Validacija i mjerna nesigurnost, *Biochemia Medica*, 20 (2010) 57-63
23. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
24. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, Hinus, Zagreb 2013.
25. P. Vinas, C. L. Erroz, N. Campillo, M. Hernandez-Cordoba, Determination of sulphonamides in food by liquid chromatography with post column fluorescence derivatization, *Journal of Chromatography A*, 726 (1996) 125-131
26. S. K. Al Deeb, I. I. Hamdan, S. M. Al Najjar, Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine, *Talanta*, 64 (2004) 695-702

27. C. K. Zacharis, P. D. Tzanavaras, Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological material: *A review of analytical methods*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (2008) 483-496
28. I. Tarcomnicu, L. Silvestro, S. R. Savu, A. Gherase, C. Dulea, Development and application of a high – performance liquid chromatography – mass spectrometry method to determine alendronate in human urine, *Journal of Chromatography A*, 1160 (2007) 21-33
29. Z. Xie, Y. Jiang, D. Zhang, Simple analysis of four bisphosphonates simultaneously by reverse phase liquid chromatography using n-amylamine as volatile ion-pair agent, *Journal of Chromatography A*, 1104 (2006) 173–178

## **Životopis**

Rođena sam 21.02.1992. godine u Splitu. Srednju školu, opću gimnaziju završila sam u Makarskoj. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu upisujem 2010. Godine. Na Zavodu za analitičku kemiju 2012. i 2013. godine odradila sam demonstraturu na kolegijima „Analitička kemija 2“ i „Kemijska analiza materijala“. Sudjelovala sam na Danima otvorenih vrata u veljači 2016. godine na Zavodu za analitičku kemiju. Stručnu praksu odradila sam 2015. godine, u Odjelu za zdravstvenu ispravnost, kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.